

α -半乳糖苷酶的重要底物 邻——硝基酚- α -D-半乳糖苷的合成

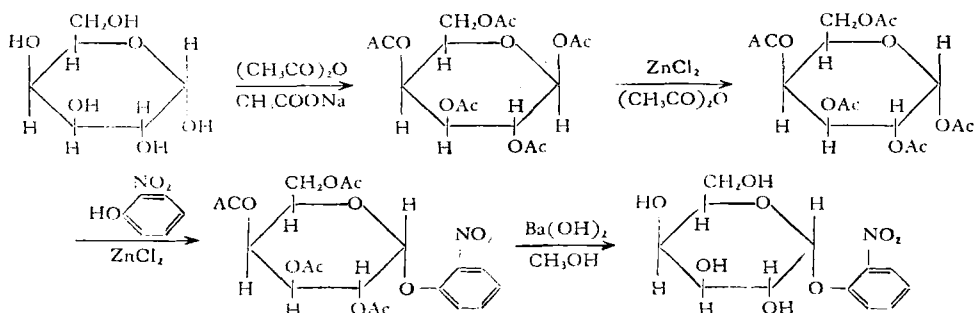
崔浩吉 卢银根

(中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂)

α -半乳糖苷酶的活力测定方法，有间接法和直接法两种。间接法是将蜜二糖先经 α -半乳糖苷酶水解，再用葡萄糖氧化酶氧化蜜二糖的水解产物——葡萄糖，以瓦氏呼吸器测定，然后推算出 α -半乳糖苷酶的活力；直接法是把邻硝基酚- α -D-半乳糖苷（简称 α -ONPG），对硝基酚- α -D-半乳糖苷（简称 α -PNPG）一类的 α -半乳糖的衍生物，作为 α -半乳糖苷酶的作用

底物。这类底物，在 α -半乳糖苷酶的作用下，能释放出有色基团，用电光比色计定量测定反应液的透光率，即可算出 α -半乳糖苷酶的活力。两种方法互相比较，直接法较间接法准确、方便、灵敏、快速。现将经我们改进了的 α -ONPG 合成方法报道如下：

化学反应原理



操作步骤

1. 五乙酰基-B-D-半乳糖 在装有回流冷凝管、机械搅拌器的三颈烧瓶中，放置 100 克 D-半乳糖、48 克无水乙酸钠、480 毫升醋酐。瓶外用沸水浴加热。回流两个半小时，并同时搅拌。待反应液冷却后，倒入盛有 4 升冰水的玻璃缸中，搅拌两小时，静置分层，吸去上清液。在沉淀物中加入 3 升冰水，搅拌 1 小时，静置分层，吸去上清液。重复上述操作一次。然后用布氏漏斗过滤，将沉淀用少量无水酒精洗一次。100℃ 烘干，得 100 克。产率 50%；熔点 138—142℃；旋光 $[\alpha]_D^{20} + 27^\circ$ （在氯仿中 $C = 4$ ）^[1]。

2. 五乙酰基- α -D-半乳糖 将 50 克上述

产品、150 毫升醋酐和 10 克新熔化并研成粉末状的氯化锌装入 500 毫升附有氯化钙干燥管的灯泡瓶中，在沸水浴中边摇边加热 20 分钟。稍冷后，将反应液慢慢倒入盛有 500 毫升冰水的烧杯中，用碳酸氢钠中和。中性液用 200 毫升氯仿抽提，水相部分再用氯仿抽提两次（每次 100 毫升）。将氯仿抽提液，在 35℃ 水浴中减压蒸发除去氯仿，残留物用最少量 95% 乙醇加热溶解，活性炭脱色，0℃ 放置过夜。次日，用布氏漏斗收集粗品，立即用 95% 乙醇重结晶。结晶物置真空干燥（ P_2O_5 ），得 30—35 克，产率 60—70%；熔点 95.5℃；旋光 $+ 106.1$ （在氯仿中 $C = 4$ ）^[2]。

3. 四乙酰基-邻硝基酚- α -D-半乳糖苷 在 500 毫升灯泡瓶中，放置 20 克上述产品，32

克邻硝基酚和 8 克新熔化并研成粉末状的氯化锌,置 120—130℃ 内保温。用水泵减压蒸发反应 20 分钟,得深红色反应液,自然冷却后,用 200 毫升水和 200 毫升苯的混合液振摇,吸去灰黄色水层,深红色苯层,用水洗二次(每次 200 毫升),再用冰冷的 2N 氢氧化钠洗三次(每次 200 毫升)。以便除去过量的邻硝基酚。最后用水将苯层洗至 pH = 6,淡黄色苯层在 40℃ 水浴中减压蒸发除去苯。残留物加少量乙醇,继续减压蒸发,直至将苯完全除净,结晶用最少量无水乙醇加热溶解,0℃ 放置过夜。次日,用布氏漏斗过滤收集结晶,结晶置真空干燥(P₂O₅)。产物 10 克,产率约 40%,熔点 160℃;旋光 $[\alpha]_D^{20} + 170^\circ$ (在氯仿中 C = 1.0)^[3]。

4. 邻硝基酚- α -D-半乳糖苷 在 250 毫升三角烧瓶中,放置 4 克四乙酰基-邻硝基酚- α -D-半乳糖苷,200 毫升无水甲醇,成悬浮液,在冰浴中冷至 0℃,滴加 4 毫升 0.4N Ba(OH)₂ 甲醇溶液,使其反应液 pH = 9,在 0℃ 放置 24 小时,并经常摇动,直至固体全部溶解(若有部分不溶可添加适量 0.4N Ba(OH)₂)。然后将水解液用阳离子树脂去钡纯化:在直径为 2 厘米的玻璃层析柱中,装入 732 树脂,树脂层高为 6 厘米,用 2N HCl 处理 [H]⁺ 型、用水洗至中性,用甲醇脱去树脂中的水,将树脂浸没在甲醇中。将水解液流经树脂(流速 40 毫升/分)。收集流出液,而后用 100 毫升甲醇洗柱,充分洗下产品,收集液在 30℃ 水浴中减压蒸发除去甲醇,结晶用最少量无水乙醇加热溶解,0℃ 下放置过夜。次日用布氏漏斗收集结晶。此结晶再用最少量无水乙醇纯化一次,置真空干燥(P₂O₅),得

1.6 克。产率 62%;熔点 145—147℃;旋光 $[\alpha]_D^{20} + 224^\circ$ (C = 0.8 在水中)^[3]。

几点说明

1. 在制备四乙酰基-邻硝基酚- α -D-半乳糖苷时,我们采用减压蒸发的方法除去反应过程中释放出来的乙酸,使反应单向进行,从而使这一步的产率由 5% 提高到 40%。应注意的是:用此方法制备的乙酰基-苯酚- α -D-葡萄糖苷需要反应两小时,而制备四乙酰基-邻硝基酚- α -D-半乳糖苷只需二十分钟,如时间过长产品将会碳化。

2. 我们用上述方法制备的四乙酰基-邻硝基酚- α -D-半乳糖苷的熔点 160℃,旋光 $[\alpha]_D^{20} + 170^\circ$,比文献报道熔点是 175—176℃ 旋光 $[\alpha]_D^{20} + 178.5^\circ$ 为低,但不必进一步纯化,因这并不影响最后产品的质量。

3. 最后产品用阳离子树脂去钡纯化时,应在低于 4℃ 的条件下进行,以免产品分解。

4. 邻硝基酚及其衍生物,紫外线照射下有显色反应,因此,可根据柱上的流出液滴在滤纸上烘干后,用紫外灯照射是否显出紫色斑点,判定是否已全部洗净。

参考文献

- [1] Erwing and Koenig.: *Bor.*, **22**, 2207, 1889.
- [2] Hudson, C. S., and Parker, H. O.: *J. A. C.* **5**, **37**, 1589, 1915.
- [3] Porter, C. J., Holmes, R.: *J. Gen. Physiol.*, **37**, 271, 1953.

[本文于 1979 年 6 月 12 日收到]

日本生物物理学研究的发展

李 晔

(中国科学院生物物理研究所)

生物物理学是一门内容丰富,正在发展中的边缘学科,目前还没有公认的一致定义。就

日本科学家们来说,他们的看法大体上是这样的:生物物理学是运用物理学的观点和方法研